

The hypoxic tumor microenvironment: from imaging to targeting

Citation for published version (APA):

Peeters, S. G. J. A. (2015). *The hypoxic tumor microenvironment: from imaging to targeting*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht.
<https://doi.org/10.26481/dis.20150709sp>

Document status and date:

Published: 01/01/2015

DOI:

[10.26481/dis.20150709sp](https://doi.org/10.26481/dis.20150709sp)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

Solid tumors are often characterized with regions of low oxygen concentrations, hypoxia, caused by chaotic blood vessel development and impaired perfusion. Those regions are known to be less sensitive to conventional anticancer treatments like chemotherapy and radiotherapy. Knowledge about the presence and location of hypoxic tumor regions can be obtained by performing a positron emission tomography (PET) scan combined with a computed tomography (CT) scan for anatomical information. The detection of hypoxia can be done in a direct manner using PET tracers that accumulate in hypoxic regions. Another approach is to use a surrogate hypoxia marker, a tracer that interacts with proteins that are upregulated in a hypoxia-dependent manner like carbonic anhydrase IX (CAIX). Since the treatment response to conventional anticancer therapies is negatively influenced by the presence of tumor hypoxia, there is a need for drugs specifically targeting those hypoxic regions. In line with hypoxia imaging, therapies against hypoxic cells can be either directed towards hypoxic cells themselves as well as directed to the hypoxia responsive proteins.

The aim of this thesis is to use the theranostic approach, combining imaging and therapy, to conduct preclinical studies in line with the concept of personalized medicine. The first part focused on the noninvasive visualization of tumor hypoxia, while the objective of the second part was to target tumor hypoxia, where possible guided by hypoxia imaging, with the aim to improve therapy outcome.

Part I: Noninvasive imaging of the hypoxic tumor microenvironment

Numerous 2-nitroimidazole based PET tracers have been developed for the noninvasive detection of tumor hypoxia. After initial validation in preclinical setting, several tracers were evaluated in clinical trials. Chapter 2 gives an overview of the tracers that have demonstrated clinical potential. Both preclinical and clinical studies are discussed with regard to validation, quantification, pharmacokinetic analysis, applications like prognostic / predictive value and monitoring of tumor hypoxia during treatment and hypoxia targeting. These studies confirm the value of noninvasive PET imaging in the monitoring of hypoxia. However, more clinical trials are needed before hypoxia PET tracers will be incorporated in daily clinical practice. So far, no direct comparison was performed between multiple hypoxia PET tracers. Most studies focus on one single tracer or a comparison with polarographic oxygen electrodes or [^{18}F]FMISO solely. In chapter 3, three clinically available hypoxia PET tracers were compared within one preclinical tumor model. For [^{18}F]FMISO, [^{18}F]FAZA and [^{18}F]HX4 the optimal imaging time point was determined together with the reproducibility of the tracer uptake over 48 hours. Sensitivity to oxygen modifications was also

investigated to characterize the differences between the tracers. This study indicates that all investigated tracers show different characteristics.

Another approach to visualize tumor hypoxia is by imaging the hypoxia responsive protein CAIX. The transcription of this protein is upregulated via 'hypoxia-inducible factor' (HIF) which binds to the 'hypoxia-response element' (HRE) on the *CA9* gene. Therefore the expression of CAIX is increased upon hypoxia and can be seen as a surrogate marker of hypoxia. For the detection of CAIX [^{18}F]VM4-037 was developed and the clinical safety of this tracer was already demonstrated in a phase I study. The uptake and CAIX specificity of [^{18}F]VM4-037 was studied in chapter 4 using two CAIX expressing preclinical tumor models. No specific uptake in the tumors could be detected, indicating that VM4-037 is not suitable for CAIX visualization.

Part II: Targeting of the hypoxic tumor regions and the hypoxia response.

Specific targeting of the hypoxic tumor regions was studied in the second part of the thesis. Drugs have been developed that are non-toxic under normal oxygen concentrations and are converted to a cytotoxic variant under hypoxia. One of these so-called 'hypoxia-activated prodrugs' is TH-302. The effect of TH-302 monotherapy and its effect in combination with chemotherapy showed promising results. In chapter 5 the combination of TH-302 and radiotherapy was investigated for the first time. Two preclinical tumor models were treated with the combination of radiotherapy and TH-302. TH-302 was demonstrated to decrease the hypoxic fraction and decrease the tumor growth, while the combination treatment of TH-302 and radiotherapy had an enhanced effect and further reduced the tumor growth. Furthermore, the hypoxic fraction before treatment as detected by [^{18}F]HX4 hypoxia imaging was associated with the treatment outcome. A clinical trial will be started to further study the effects of TH-302 in combination with radiotherapy.

In chapter 6 and 7 the potential of small molecule inhibitors of CAIX in improving radiotherapy outcome was studied. The expression of CAIX is mostly tumor specific and upregulated under hypoxic conditions. Furthermore, CAIX is known to have a role in the cellular pH balance; it maintains a stable intracellular pH while it acidifies the extracellular environment contributing to more aggressive cellular behavior. An indanesulfonamide specifically targeting CAIX function was studied in chapter 6 in combination with radiotherapy and showed a reduction in the tumor growth. The effect of a dual targeting compound, DH348, was assessed in chapter 7. The novelty of this compound lies within its two sided function; the sulfonamide part is directed

against the active site of CAIX while the 5-nitroimidazole part functions as a radiosensitizer in hypoxic areas. The effect of the dual targeting drug DH348 was demonstrated to be more effective in combination with radiotherapy than the single CAIX targeting drug.

In conclusion, this thesis confirms the potential of hypoxia PET tracer to monitor tumor hypoxia and further characterizes the different tracers on a preclinical level. Furthermore, specific targeting of hypoxia using the hypoxia activated prodrug TH-302 or inhibitors of CAIX has been shown to radio-sensitize tumors and improve the outcome in a combined treatment. Most important, the ability of [^{18}F]HX4 to monitor tumor hypoxia over TH-302 treatment has been demonstrated as well as the association between pretreatment hypoxia imaging and therapy outcome. This theranostic approach demonstrates the strength of combining hypoxia imaging and targeting.

Samenvatting

Een veel voorkomend kenmerk van solide tumoren is het gebrek aan zuurstof in sommige gebieden. Deze zuurstof arme gebieden worden ook wel hypoxische gebieden genoemd en worden veroorzaakt door chaotisch gevormde bloedvaten waardoor zowel de perfusie als de diffusie van zuurstof in de tumor wordt beperkt. Het is bekend dat deze hypoxische gebieden minder gevoelig zijn voor kanker behandelingen zoals chemotherapie en bestraling / radiotherapie. Een PET scan kan informatie geven over de aanwezigheid van tumor hypoxie en wordt vaak gecombineerd met een CT scan voor anatomische informatie. Een PET scan maakt gebruik van radioactief gelabelde tracers die worden geïnjecteerd in een patiënt en die specifiek accumuleren in zuurstof arme gebieden waardoor de aanwezigheid van hypoxie kan worden gedetecteerd. Een andere manier om hypoxie te detecteren is door middel van een surrogaat hypoxie merker; een tracer die bindt aan een eiwit dat wordt gereguleerd door hypoxie en enkel onder lage zuurstof condities aanwezig is. Een eiwit waarvan de expressie op deze manier wordt geregeld is koolzuur anhydrase ofwel carbonic anhydrase IX (CAIX).

Het succes van de klassieke kanker behandelingen wordt negatief beïnvloed door de aanwezigheid van hypoxie en daarom zijn er nieuwe medicijnen nodig die specifiek gericht zijn tegen deze gebieden. Net als bij hypoxie beeldvorming kan de anti-hypoxie therapie worden gericht direct tegen de hypoxie zelf, maar ook tegen de eiwitten die worden gereguleerd onder hypoxie.

Het doel van dit proefschrift is om door middel van een theranostische benadering, het combineren van beeldvorming/diagnostiek en therapie, studies uit te voeren volgens het concept van gepersonaliseerde geneeskunde. Het eerste deel van het proefschrift is gericht op de niet-invasieve beeldvorming van tumor hypoxie, terwijl het tweede deel van zich richt op nieuwe therapieën tegen tumor hypoxie, waar mogelijk gecombineerd met hypoxie beeldvorming.

Deel 1: Niet-invasieve beeldvorming van de hypoxische tumor omgeving

Verschillende PET tracers zijn gebaseerd op een 2-nitroimidazole scheikundige groep en zijn ontwikkeld voor de niet-invasieve detectie van tumor hypoxie. De eerste validatie van deze tracers gebeurt in preklinische modellen voordat ze verder worden geëvalueerd in klinische studies. In hoofdstuk 2 wordt een overzicht gegeven van tracers met een bewezen klinische potentie. Hierin worden zowel preklinische als klinische studies beschreven met betrekking tot validatie, kwantificatie, farmacokinetische analyses, toepassingen zoals prognostische en predicatieve waarde en het

opvolgen van tumor hypoxie tijdens de conventionele anti-kanker behandeling of specifieke hypoxie gerichte therapie. Al deze studies tonen de toegevoegde waarde van niet-invasieve PET beeldvorming in het opvolgen van tumor hypoxie. Er zijn echter meer klinische studies nodig voordat hypoxie PET beeldvorming daadwerkelijk zal worden toegepast in de dagelijkse praktijk. Tot op heden zijn er geen studies uitgevoerd die een directe vergelijking maken tussen verschillende hypoxie PET tracers. De meeste studies bestuderen één enkele tracer en vergelijken deze enkel met invasieve technieken of met de eerst ontwikkelde hypoxie PET tracer [^{18}F]FMISO. In hoofdstuk 3 worden drie klinisch beschikbare hypoxie PET tracers vergeleken binnen één preklinisch tumor model. Voor [^{18}F]FMISO, [^{18}F]FAZA en [^{18}F]HX4 werd het optimale tijdstip voor beeldvorming bepaald samen met de reproduceerbaarheid van de tracer opname over een tijdsinterval van 48 uur. Daarnaast werd de gevoeligheid aan veranderingen in zuurstof concentratie bepaald voor de verschillende tracers. Deze studie laat zien dat de drie bestudeerde tracers verschillende karakteristieken hebben.

Een andere manier om tumor hypoxie in beeld te brengen is door middel van beeldvorming van de moleculaire reactie ten gevolge van hypoxie en CAIX is een van de eiwitten die hiervoor geschikt is. De transcriptie van dit eiwit wordt gereguleerd door de 'hypoxie-induceerbare factor' (HIF) waardoor CAIX verhoogd tot expressie komt onder hypoxische condities en kan worden gezien als een surrogaat marker voor hypoxie. Voor de detectie van CAIX is een PET tracer ontwikkeld, [^{18}F]VM4-037, waarvan in een klinische fase I studie de veiligheid voor patiënten is aangetoond. Hoofdstuk 4 bestudeerd in welke mate [^{18}F]VM4-037 specifiek is voor CAIX door gebruik te maken van twee CAIX positieve preklinische tumor modellen. In de tumoren wordt echter geen specifieke opname van de tracer gedetecteerd en hierdoor lijkt [^{18}F]VM4-037 niet geschikt voor de visualisatie van CAIX.

Deel II: Therapieën tegen de hypoxische tumor gebieden

Het tweede deel van dit proefschrift onderzoekt therapieën die specifiek gericht zijn tegen de hypoxische gebieden in de tumor. Er bestaan medicijnen die niet werkzaam zijn onder normale zuurstof concentraties en die worden geactiveerd onder hypoxie waardoor ze specifiek deze cellen doden. TH-302 is een van deze zogenaamde 'hypoxie geactiveerde pro-drugs'. De werking van TH-302 als monotherapie en het effect in combinatie met chemotherapie is al aangetoond en lijkt veelbelovend. In hoofdstuk 5 wordt de combinatie van TH-302 en radiotherapie voor de eerste keer bestudeerd. Twee preklinische modellen worden behandeld met de combinatie therapie van TH-

302 en radiotherapie. Behandeling met enkel TH-302 laat een afname in de hoeveelheid hypoxie zien en een vertraging in de tumor groei, terwijl de combinatie behandeling van TH-302 en radiotherapie de tumor groei nog verder vertraagd. Door middel van [^{18}F]HX4 hypoxie PET beeldvorming wordt de hypoxische fractie bepaald voor de start van de behandeling en deze is geassocieerd met het effect van TH-302 behandeling. Een klinische studie wordt gestart om het effect van TH-302 in combinatie met radiotherapie verder te bestuderen.

In hoofdstuk 6 en 7 wordt onderzocht of CAIX geremd kan worden door middel van een klein molecuul dat bindt aan het actieve deel van CAIX en of hiermee het effect van radiotherapie kan worden vergroot. CAIX wordt voornamelijk in de hypoxische tumor gebieden tot expressie gebracht waar het een rol heeft in de pH balans van de cel; het draagt bij aan een stabiele intracellulaire pH en gaat samen met verzuring van de extracellulaire omgeving waardoor een cel agressiever gedrag gaat vertonen. Hoofdstuk 6 bestudeert een indanesulfonamide dat specifiek gericht is tegen CAIX en in combinatie met radiotherapie laat dit een afname van de tumor groei zien. In hoofdstuk 7 wordt DH348, een samengesteld molecuul, onderzocht. Het vernieuwende aspect van dit molecuul is de tweezijdige functie; het sulfamide deel is gericht tegen het actieve deel van CAIX terwijl het 5-nitroimidazole gedeelte de hypoxische gebieden gevoeliger maakt voor bestraling. Wanneer DH348 wordt gecombineerd met radiotherapie is het effect hiervan groter dan van een molecuul dat enkel tegen CAIX gericht is.

Concluderend laat dit proefschrift zien dat PET beeldvorming de potentie heeft om de mate van hypoxie in de tumor te bepalen en werden verschillende karakteristieken van enkele hypoxie tracer bestudeerd op preklinisch niveau. Daarnaast werd het effect van medicijnen, specifiek gericht tegen hypoxie, onderzocht door middel van twee benaderingen; TH-302 wat wordt geactiveerd onder lage zuurstof concentraties en remmers van het hypoxie gereguleerde eiwit CAIX. Beide therapieën laten zien dat de tumor gevoeliger wordt voor bestraling wat zorgt voor een betere uitkomst. Bovendien is [^{18}F]HX4 in staat tot hypoxie beeldvorming gedurende de TH-302 behandeling en is er een associatie tussen de hypoxische fractie, gedetecteerd voor de behandeling, en het effect van behandeling. Deze theranostische benadering bevestigt de kracht van het combineren van hypoxie beeldvorming en het specifiek richten van een behandeling tegen hypoxie.